

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:16-18000  
低温运输, -20℃保存

**BINGENE**

狂犬病病毒通用荧光及可视化 RT-LAMP 试剂盒  
Rabies Virus Fluorescent & Colorimetric RT-LAMP Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: [www.bingene.com](http://www.bingene.com); 电话: 400-6605850; 电邮: [order@bingene.com](mailto:order@bingene.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>狂犬病病毒 (Rabies Virus, RV) 属于弹状病毒科狂犬病毒属, 为 RNA 病毒, 它是引起狂犬病的病原体。狂犬病毒会引发狂犬病, 属于人畜共患的传染病。由于该病毒能对人体健康造成严重损害, 因此狂犬病病毒的快速准确鉴定有重要意义, 为此本公司根据独有的双染料 RT-LAMP 技术, 开发了简单快捷的狂犬病病毒 RT-LAMP 检测试剂盒, 它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 即开即用, 用户只需要提供病毒 RNA 样品。</li> <li>2. 恒温扩增, 可以不需要荧光 PCR 等贵重仪器。</li> <li>3. 含可见光和荧光染料, 既可以用金属浴和水浴扩增用可见光肉眼判断结果, 也可用荧光 PCR 仪进行实时荧光检测。</li> <li>4. 检测灵敏性一般比 RT-PCR 高 10 倍以上, 分析灵敏度可以达到 100 拷贝/反应左右。</li> <li>5. 特异性高, 根据狂犬病病毒 RNA 保守序列设计 4 条特异引物, 不会跟其他生物的 RNA 发生交叉反应。</li> <li>6. 一般 30 分钟内出结果, 比 RT-PCR 快。</li> <li>7. 提供无传染性的阳性对照, 便于分析实验结果。</li> <li>8. 本产品只能用于定性分析, 不推荐用于定量分析。</li> <li>9. 上样量大, 对 20 <math>\mu</math>L 的反应体系, 最大样品加样量高达 13<math>\mu</math>L。</li> <li>10. 内含的 dUTP-UNG 可防交叉污染。</li> <li>11. 本产品足够 50 次 20 <math>\mu</math>L 体系的染料法荧光及可视化 RT-LAMP 扩增。</li> <li>12. 只可用于科研。</li> </ol>																												
<p><b>规格及成分</b></p>	<p style="text-align: center;">本产品采用五孔盒包装</p> <table border="1" data-bbox="427 1451 1437 1895"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料, 待加酶)</td> <td>211224a</td> <td>200<math>\mu</math>L</td> <td>0.5 mL 本色盖</td> </tr> <tr> <td>逆转录酶-扩增酶混合液</td> <td>211208b</td> <td>100<math>\mu</math>L</td> <td>0.5 mL 红盖管</td> </tr> <tr> <td>20<math>\times</math>狂犬病病毒 RT-LAMP 引物混合液</td> <td>yw16-18000</td> <td>50<math>\mu</math>L</td> <td>0.5 mL 白盖管</td> </tr> <tr> <td>狂犬病病毒 RT-LAMP 阳性对照 (1<math>\times</math>10E4 拷贝/<math>\mu</math>L)</td> <td>Pc18000</td> <td>250<math>\mu</math>L</td> <td>0.5 mL 黄盖管</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>210806</td> <td>1 mL</td> <td>1.5 mL 蓝盖管</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>16-18000sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料, 待加酶)	211224a	200 $\mu$ L	0.5 mL 本色盖	逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 $\mu$ L	0.5 mL 红盖管	20 $\times$ 狂犬病病毒 RT-LAMP 引物混合液	yw16-18000	50 $\mu$ L	0.5 mL 白盖管	狂犬病病毒 RT-LAMP 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	Pc18000	250 $\mu$ L	0.5 mL 黄盖管	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管	使用手册	16-18000sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																										
RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料, 待加酶)	211224a	200 $\mu$ L	0.5 mL 本色盖																										
逆转录酶-扩增酶混合液	211208b	100 $\mu$ L	0.5 mL 红盖管																										
20 $\times$ 狂犬病病毒 RT-LAMP 引物混合液	yw16-18000	50 $\mu$ L	0.5 mL 白盖管																										
狂犬病病毒 RT-LAMP 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	Pc18000	250 $\mu$ L	0.5 mL 黄盖管																										
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管																										
使用手册	16-18000sc	1 份	无																										
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>低温运输, -20<math>^{\circ}</math>C 保存, 保存期限为一年。</p>																												
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>待测样品。</p>																												

## 使用方法

### 一、样品 RNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容，包括本公司的免提取的核酸释放剂。
2. 如果有 N 个样品，则需要做 N+2 个样品制备，包括一个样品制备阳性对照(PC) 和一个样品制备阴性对照 (NC)。PC 用 10 $\mu$ L 本试剂盒提供的阳性对照 (1  $\times$  10E4 拷贝/ $\mu$ L) 加一定量的水充当，总体积必须核酸纯化试剂盒所要求的起始样品体积一样，NC 用水替代。

### 二、RT-LAMP 反应 (20 $\mu$ L 体系)

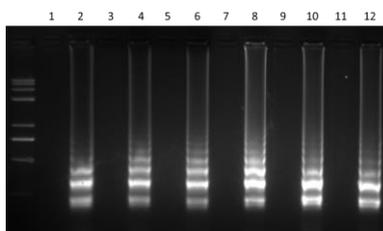
3. 注意：第一次使用一个新的试剂盒时，必须先将 100 $\mu$ L 逆转录酶-扩增酶混合液全部加入到 RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料，待加酶) 中，盖上盖子后轻柔颠倒 1 分钟混匀，然后再取用。
4. 反应设置：如果有 N+2 个 RNA 纯化样品，则最好设置 N+4 个 RT-LAMP 扩增，增加 RT-LAMP 阴性对照和 RT-LAMP 阳性对照各 1 个。在 N+4 个 PCR 管中加入下列成分：

成分	N+2 个样品管	RT-LAMP 阴性对照	RT-LAMP 阳性对照
RT-LAMP MasterMix (可视化染料-荧光染料，已加酶)	各 6 $\mu$ L	6 $\mu$ L	6 $\mu$ L
20 $\times$ 狂犬病病毒 RT-LAMP 引物混合液	各 1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
N+2 个样品 RNA	各 13 $\mu$ L	-	-
超纯水	-	13 $\mu$ L	-
狂犬病病毒 RT-LAMP 阳性对照 (1 $\times$ 10E4 拷贝/ $\mu$ L)	-	-	13 $\mu$ L

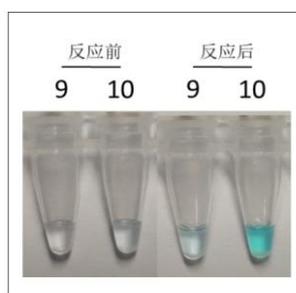
5. 本产品含两种染料，故最好使用荧光 PCR 仪器进行扩增。设置 60 次循环，每次 65 $^{\circ}$ C 保温 1 分钟，采集 SYBR 通道的荧光信号。

### 三、结果分析

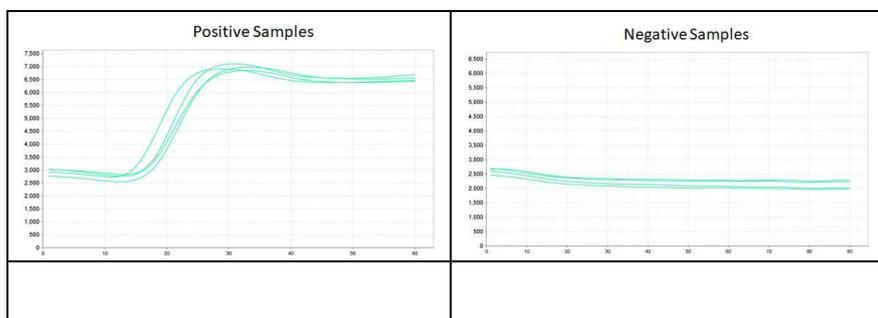
6. 电泳分析：由于取样时非常容易产生气溶胶污染，污染实验环境并且非常难清除污染，所以强烈建议不要采取此方法分析实验结果。即使使用，也要在不同的房间，使用不同的移液枪操作。具体做法是取 10 $\mu$ L RT-LAMP 扩增产物跟自备上样液混合后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。RT-LAMP 阳性对照必须有正常 RT-LAMP 条带 (200bp 左右的梯形扩增产物)，RT-LAMP 阴性结果必须无条带，否则实验结果无效。如果 RT-LAMP 阳性对照和阴性对照结果正常，再分析待测样品。典型的电泳结果见下表，奇数样为阴性结果，偶数样为阳性结果：



7. 可将光（肉眼）分析：样品制备阳性对照和 RT-LAMP 阳性对照的反应液将呈蓝色，样品制备阳性对照和 RT-LAMP 阳性对照的反应液将呈淡蓝色或无色，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的颜色接近扩增阳性对照管则说明样品为阳性，如果接近阴性对照则说明待测样品为阴性。典型的可将光检测结果见左图（9 为阴性，10 为阳性）。



8. 荧光分析（仅限于用 qPCR 仪进行反应的场景）：样品制备阳性对照和 RT-LAMP 阳性对照的反应液将有标准的 S 扩增曲线，样品制备阴性对照和 RT-LAMP 阴性对照的反应液将没呈平线，没有 S 曲线，否则提取实验或扩增实验无效。如果阳性和阴性对照结果正常，则实验有效，可以分析样品的情况。样品管的荧光曲线为 S 型，则说明样品为阳性，如果为平线则说明待测样品为阴性。典型的荧光检测结果见下图。左边为阳性，右边为阴性。



**关联产品**

狂犬病病毒荧光定量 RT-PCR 试剂盒